第10卷　第2期　　动　物　学　研　究　　Vol. 10, No. 2
1989年5月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　May., 1989

一种新的制备哺乳动物精母细胞联会复合体的微铺展技术

史庆华　施立明

（中国科学院昆明动物研究所）

摘　要

本文报道一种新的制备哺乳动物精母细胞联会复合体（SC）的微铺展法，与常规铺展法比较，具有简便易行，适用于野外工作等特点。此外，微铺展法不仅可用新鲜材料，而且还可用长期冷冻保存的材料来制备SC标本。

关键词：联会复合体，哺乳动物，精母细胞

联会复合体（Synaptonemal complex, SC）是减数分裂前期同源染色体配对形成的一种核内非永久性结构。早期的SC研究，主要采用电镜连续切片的三维重组方法。由于方法的复繁，SC的深入研究和实际应用受到了一定的限制。直到70年代，由于界面铺展技术的发明(Counce and Meyer, 1973)和银染色的应用(Dresser *et al*., 1980)，SC的研究开始蓬勃发展。迄今，SC标本的制备方法有超薄切片。三维重组法（Wettstein *et al*., 1967）、界面铺展法、微离心法（Tres *et al*., 1981）、去污剂处理法（Albini, 1984 a、b）和低渗法（冯蜀举等，1986）等。这些方法各有特点和应用范围，但也各有一定的局限性。下面报道的是我们实验室改进、发展的另一种新方法，我们称之为微铺展法。

材料与方法

一、实验动物

1.雄性性成熟金黄地鼠（*Mesocricetus auratus*）、昆明品系小鼠（*Mus musculus*）、豚鼠（*Cavia porcellus*）各一只，皆由本所饲养场提供。麻醉处死，取出睾丸，立即制作SC标本。

2.雄性性成熟猕猴（*Macaca mulatta*）和赤麂（*Muntiacus muntjac*）各一只，

本文1988年4月7日收到。

手术取出睾丸，以199培养基制备细胞悬浮液，加10%二甲基亚砜（DMSO）作为防冻剂。保存于－196℃液氮中约两年。

二、方法

1.微铺展法：取少量精小管置小匀浆器中适度破碎，再加入0.3%柠檬酸钠制成细胞悬浮液。室温下低渗10～15分钟。再取上述细胞悬浮液一滴于涂有Falcon膜的载玻片（将洁净载玻片置0.5%Falcon塑料氯仿溶液中，约5秒钟后取出即可）上，涂匀。空气干燥。置4%多聚甲醛溶液（含3.4%蔗糖和0.1%十二烷基硫酸钠）中固定5～10分钟。晾干。按Howell & Black（1980）的方法进行硝酸银染色。在清水中漂浮带有细胞的Falcon膜。将膜置于光学显微镜下观察，寻找SC形态清晰的区域。放上单椭圆孔铜网。用日立H—300型电镜观察（电压75KV）。拍照。

2.常规铺展法：为比较起见，在实验中我们也应用了在Moses（1977）的方法基础上修改的常规铺展法。取一小块睾丸组织，在0.4%KCl中剪碎。静置15～20分钟。吸取细胞悬浮液。离心（700转/分）7分钟。弃去上清液，加少量0.4%KCl制成细胞悬浮液。用吸管吸取少量细胞悬浮液，轻轻接触液泡表面。约20秒钟后，以涂有Falcon膜的载玻片轻轻接触液泡。细胞即贴于载玻片上。其他步骤同上。

结果与讨论

1.用微铺展法和常规铺展法制备5种哺乳动物精母细胞的联会复合体，并进行了比较研究。发现这两种方法制备的SC形态、连续性和清晰度均无明显差别（图版Ⅰ,a、b）。但用微铺展法制备SC标本，成功率较高，可用于观察分析的细胞也比较多。此方法只需少许精细管即足以制备、分析。因此特别适用于珍稀动物，用活检手术取少许睾丸组织即足够实验之需。微铺展法不需离心，实验条件要求简单。适用于野外的细胞遗传学工作。且方法简便、易于掌握。总之，与常规铺展法相比较，微铺展法是一种值得推广的新技术。

2.从图版Ic-f可以看出，无论是常染色体SC侧轴，还是x轴或y轴，都有明显的双线结构。这与以往报道的SC侧轴双线结构一致（Moses，1968；Counce *et al*.，1973；Dresser *et al*.，1980；冯蜀举等，1986）。只是双线结构不仅表现在SC的顶端，而且还呈现在SC的近端（图版Ic）和中部（图版Id-f）。更值得注意的是，图版Ic中SC四条线状结构清晰可见。这就进一步证实了Moses（1977）SC侧轴与染色体轴心结构相当的假说。

需要指出的是，在同一细胞中，不是每条SC的侧轴都呈现双线结构。Dresser *et al*.，(1980）认为这与细胞所处的时期有关。我们认为还可能与动物种类及制片的技术因素有关。例如在本工作研究的5种动物中，仅金黄地鼠、小鼠和豚鼠的SC侧轴呈双线结构。在用微铺展法制备的小鼠SC标本中，性染色体轴呈双线结构的出现率高达80%，而用常规铺展法制备的小鼠SC标本，则很少看到性染色体轴呈双线结构。因此，微铺展法似乎更利于显示SC的双线性这样一些精细结构。

3.作者采用微铺展技术，还对长期超低温冻存的赤麂、猕猴的精母细胞进行了SC研

究（图版Ⅰa. b）。其SC的分散程度、连续性、侧轴间的距离和清晰度，与由新鲜材料制备的小鼠、豚鼠SC（图版Ⅱc. d）几可媲美。这表明微铺展法不仅适用于新鲜材料，而且适用于冻存的哺乳动物精母细胞。在细胞遗传学工作中，要得到一些野生、特别是珍稀动物的新鲜睾丸作实验材料，有时是十分困难的。因此，我们这一发现对珍稀哺乳动物减数分裂的显微观察，提供了一条新的、方便的途径。

参 考 文 献

冯蜀举，施立明 1986 德国蜚蠊精母细胞联会复合体（SC_s）组型及辐射诱发的SC_s畸变。遗传学报 13（5）：377—382。

Albini, S. M. and Johes, G. H. 1984 Synaptonemal complexassociated centromeres and recombination nodules in plant meiocytes prepared by an improved surfacespreading technique. *Exp. Cell Res.* 155:588-592.

Albini, S. M. *et al.*, 1984 A method for preparing twodimensional surface-spreads of synaptonemal complex from plant meiocytes for light and electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 152:280-284.

Counce, S. T. and Meyer, G. F. 1973 Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in Locusta spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. *Chromosoma* 44:231-252.

Dresser, M. E. and Moses, M. J. 1980 Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese Hamster (Cricetulus griseus) IV Light and electron microscopy of synapsis and nucleolar developing by silver staining. Chromosoma 76: 1 -22.

Howell, W. M. and Black, D. A. 1980 Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidel developer:al-step method. *Experimentia* 36:1014.

Moses, M. J. 1968 Synaptonemal complex *Ann. Rew. Genet.* 2 :363-412.

Moses, M. J. 1977 Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese Hamster (Cricetulus griseus). I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations. *Chromosoma* 60:99-125.

Tres, L. L. and Kierszenbaum, A. L. 1981 Meiotic chromosomes of mouse spermatocytes indentification and transcription actives. in:Bioreculatois of Reproductions p229-256, New York Academic Press.

Wettstein, R. and Sotelo, J. R. 1967 Electron microscope serial reconstruction of the spermatocyte I nuclei a pachytene. *J. Microscopie* 6:557-576.

A NEW MICRO-SPREADING TECHNIQUE FOR DEMONSTRATING SYNAPTONEMAL COMPLEXES IN MAMMALIAN SPERMATOCYTES

Shi Qinghua Shi Liming

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

A new micro-spreading technique for demonstrating synaptonemal complexes (SC) has been described. This method gives more consistent results than the rou-

tine spreading technique. Furthermore, the ease and speed should allow successful application of this new simple method to field cytogenetic work. In addition, our results also indicated that both fresh and long-time frozen spermatocytes in liquid nitrogen can be used for preparing SC.

Key words: Synaptonemal complex (SC), Mammal, Spermatocytes.

群分析在研究虫草蝠蛾幼虫生长发育中的应用初探*

A PRELIMINARY INVESTGATION ON THE APPLICATION OF CLUSTER ANALYSIS IN STUDIES ON THE GROWTH OF THE LARVAE (*HEPIALUS*)

关键词：虫草蝠蛾幼虫，氨基酸，微量元素，群分析。
Key words: Hepialid larvae, Amino acid, Trace elements, Cluster analysis.

在进行人工饲养虫草蝠蛾幼虫的研究过程中，我们测定了2～6龄各五个龄期组的幼虫，四个不同发育阶段的虫草菌丝体组（分别培养45、60、80、100天）、子实体、僵虫体和全虫草等12个样品组的氨基酸和微量元素组成，每组各测18个微量元素和17个氨基酸指标共35个变量。发现各样品与变量间存在一些关系，将测定取得的12×35＝420个原始数据，借助IBM-PC型电子计算机，用Besic语言编制程序进行计算分析。试图揭示其中的某些规律，以期为饲养该幼虫提供可资参考的依据。

一、各样品间的群分析（Q模式系统）

群分析是研究含多个变量的样品与样品间分类问题的一种多元统计方法。这里具体选用相似系数（夹角余弦）作为度量样品间相似程度的统计量，算出12个样品（每样品含35个变量）的聚类顺序，根据聚类顺序划出分群图。结果显示四个虫草菌组与子实体组聚为一类群，前者愈培养至晚期愈接近后者，这一结果与朱婉华（1987）的结论相类似；五、六、三、二龄虫组、僵虫体组与全虫草组为一聚类群，其中五、六龄虫与虫草最接近，这与自然条件下前者易被感染成虫草不无联系。同时，所得结果亦说明：处于不同发育历期的幼虫、虫草菌，对微量元素和氨基酸的吸收和积累是各不相同的，各自有着特定的比例。

二、微量元素在不同发育历期的幼虫、虫草菌中的贡献值

采用对应因子分析法来研究样品与变量间的内在联系，从而揭示各变量对所研究样品的贡献值。设原始变量$X=\{X_{ij}\}$，它是N×M阶矩阵，其中N＝12（样品数）；M＝18（变量数，即各样品的微量元素测定值）；X_{ij}表示第i个样品的第j个变量的观测值，具体算法参照David（1974）的方法。根据计算结果，划出对应因子分析载荷图。结果显示：Ca对六、四龄虫；Mg、Na对五龄虫；Fe和P分别对三、二龄虫等的贡献值显著。Al、Co、Si、Na、P、Ni与培养80和100天的虫草菌为一自然聚类群，Zn对培养45天的虫草菌的贡献值亦较显著。

三、各样品中的氨基酸与微量元素积累量的相关分析

本节采用含多个随机变量的样本线性相关分析法对各样品中的微量元素、氨基酸积累量的相关关系进行分析。把每一氨基酸看做随机变量y_t，对应18种微量元素x_1，x_2，……x_{18}（自变量）变化，则有12组（样品组）观测数据：(y_t，x_{1t}，x_{2t}，x_{3t}，……x_{18t})，其中t＝1，2，……12。参照上海计算技术研究所（1982）的方法分别对17种氨基酸逐步回归，得到相关性较显著的回归方程如下：

酪氨酸$TYR=-0.20276+0.9352[Na^{+}]+0.1358[Mg^{2+}]$ （1）

谷氨酸$GLU=-0.0974+0.6729Mg-0.0907Cu$ （2）

丙氨酸$ALA=0.1842+1.0572[P^{+3}]+0.3106[Fe^{2+}]-0.0478[Zn^{2+}]$ （3）

从以上结果看出：幼虫体内积累一些微量元素与自身合成或吸收某些氨基酸有关，如所选用的刚蜕皮后的五龄幼虫组，在新表皮形成、蛋白质鞣化和暗化过程中，必然利用大量的酪氨酸，而方程〈1〉显示酪氨酸与Na^{+}、Mg^{2+}呈显著正相关，因而Na^{+}和Mg^{2+}对该组幼虫贡献值就显著；1～3龄幼虫多在冻土中渡过。因而二、三龄组幼虫积累Fe^{2+}、P^{3+}有助于合成丙氨酸（方程〈3〉）。有利于幼虫的抗寒。

杨跃雄 陆源 杨大荣 沈发荣 董大志 何远辉
（中国科学院昆明动物研究所）

* 国家自然科学基金和云南省科委资助项目
本文1988年2月2日收到，同年2月26日修回。

图版Ⅰ

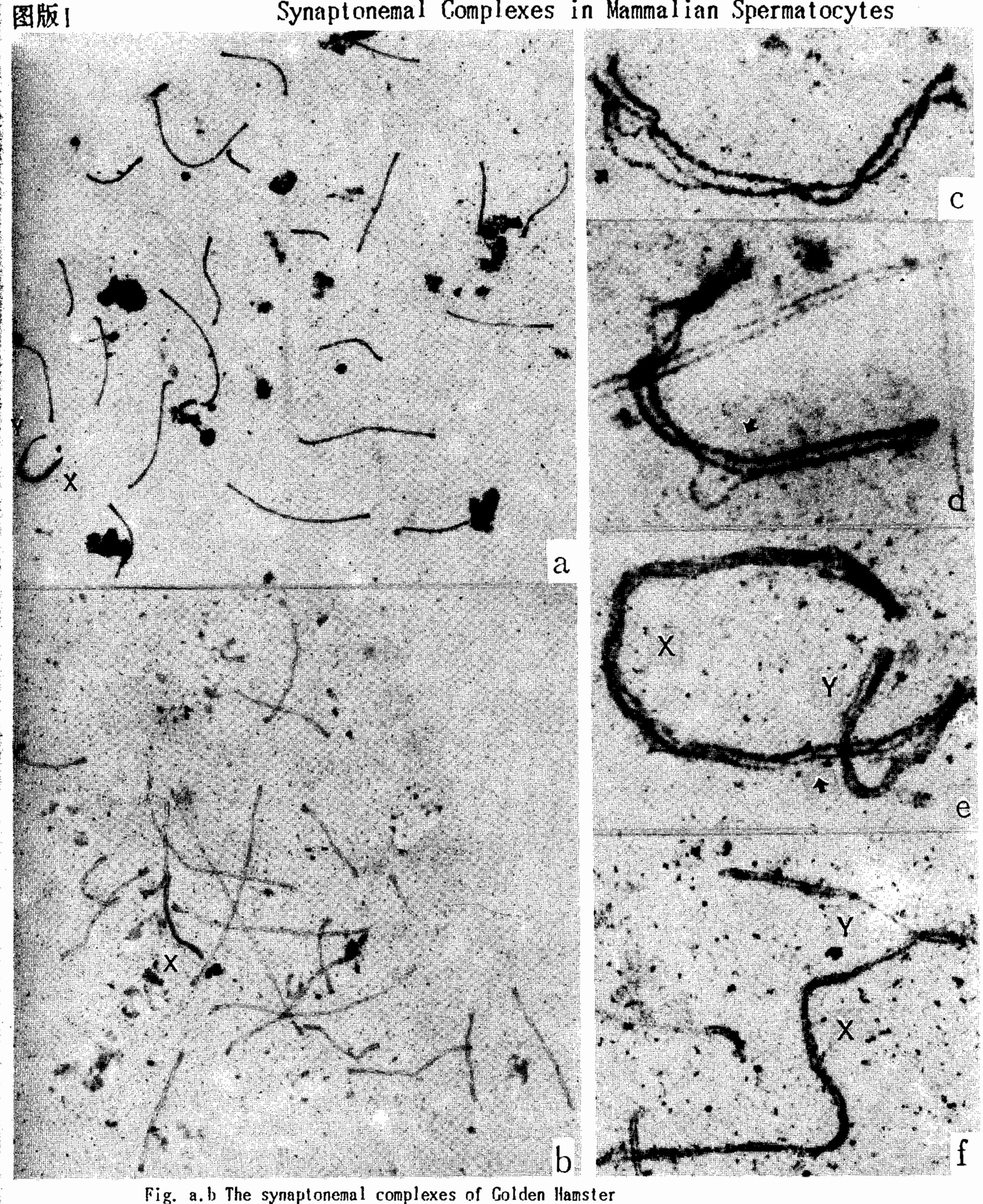


Fig. a.b The synaptonemal complexes of Golden Hamster
a. prepared by routine spreading technique
b. prepared by microspreading technique
Fig. c-f The fine structure of synaptonemal complexes
c. four strands of autosomal SC of guinea pig (arrow)
d. three strands of autosomal SC of guinea pig (arrow)
e. two strands of X axis of mouse (arrow)
f. two strands of Y axis of mouse (arrow)

图版 II

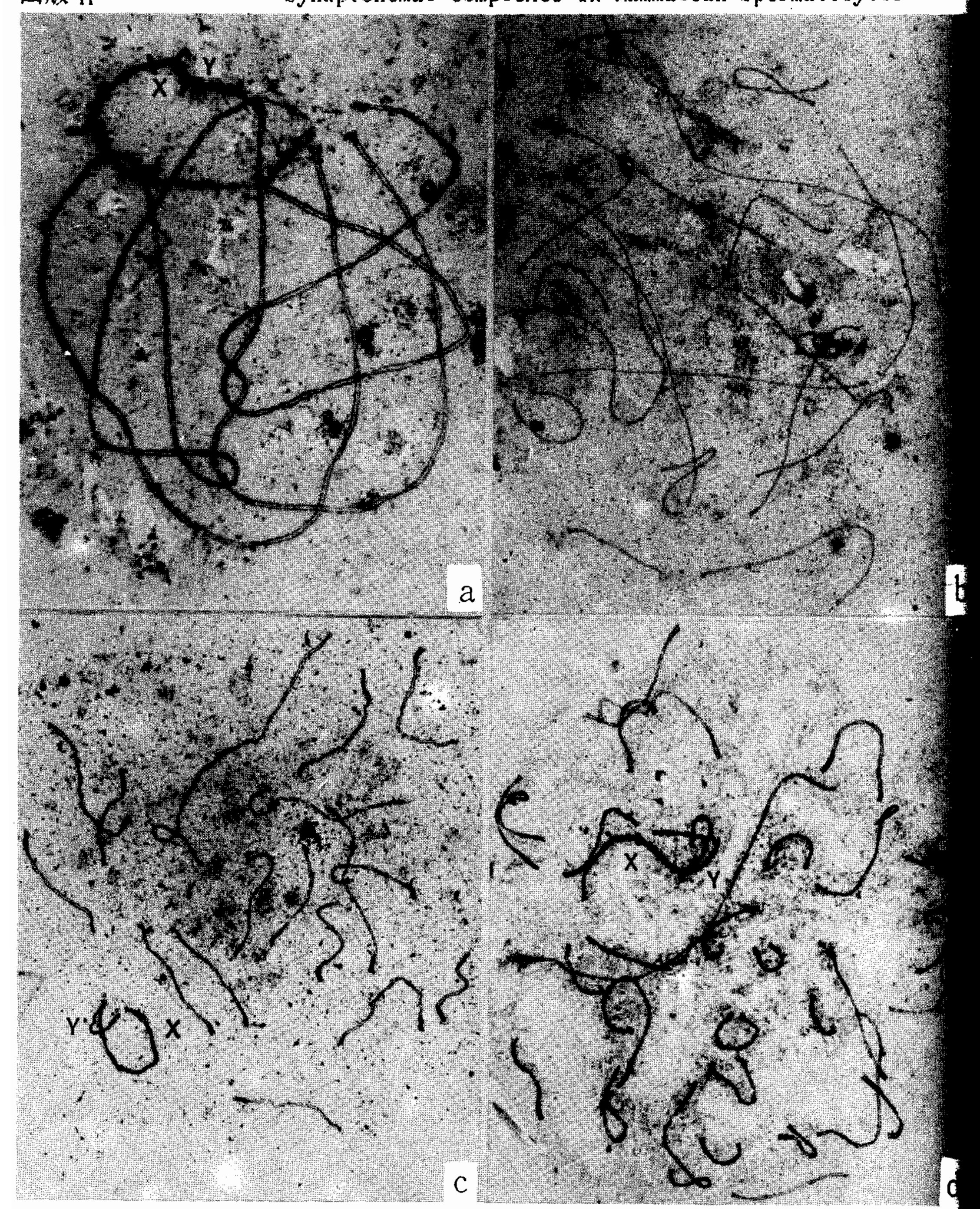
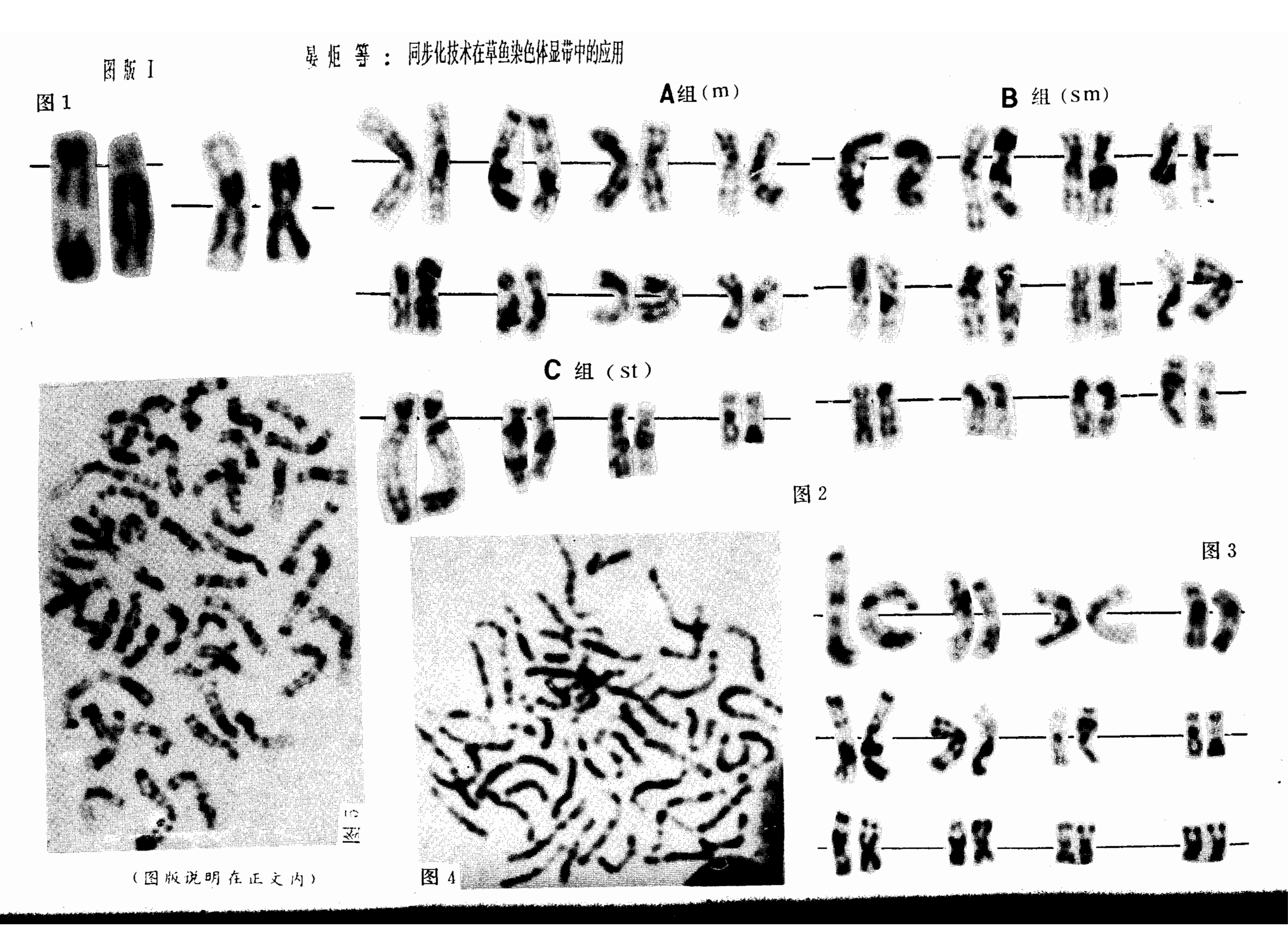


Fig. II The mammalian synaptonemal complexes prepared by microspreading technique a. Red muntjac b. Rhesus monkey c. Mouse d. Guinea pig

图版 I



（图版说明在正文内）

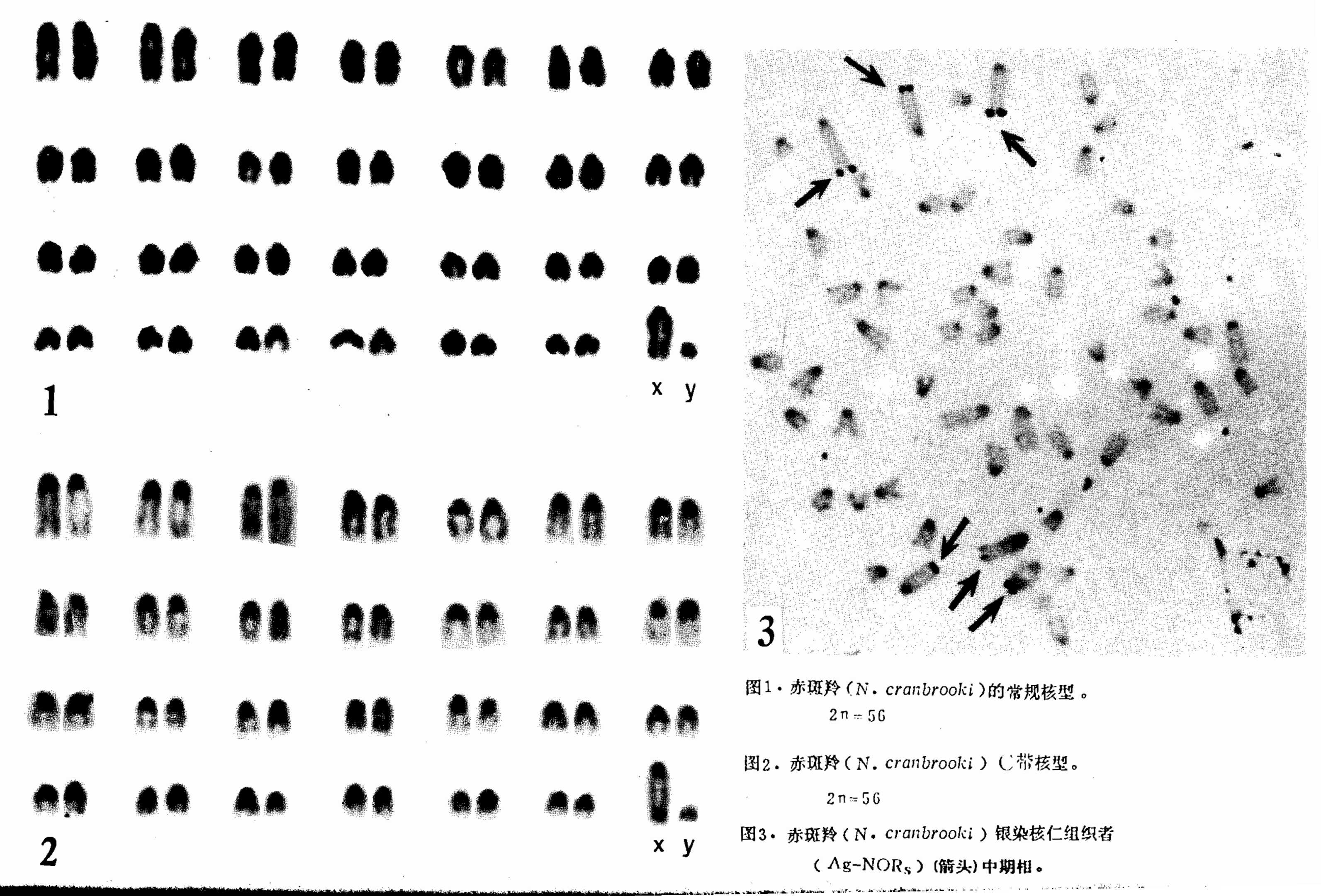


图1．赤斑羚（*N. cranbrooki*）的常规核型。
2n=56

图2．赤斑羚（*N. cranbrooki*）C带核型。
2n=56

图3．赤斑羚（*N. cranbrooki*）银染核仁组织者（Ag-NORs）（箭头）中期相。